

МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ

УТВЕРЖДАЮ
Первый заместитель Министра

_____ Р.А. Часнойть
23 марта 2007 г.
Регистрационный № 41-0305

**ПОДГОТОВКА КУЛЬТУРЫ КЛЕТОК ЩИТОВИДНОЙ ЖЕЛЕЗЫ
ДЛЯ ТРАНСПЛАНТАЦИИ**

инструкция по применению

УЧРЕЖДЕНИЕ-РАЗРАБОТЧИК: УО «Белорусский государственный
медицинский университет»

АВТОРЫ: д-р мед. наук, проф. С.И. Третьяк, канд. мед. наук В.А. Горанов

Минск 2007

Заместительная терапия гипотиреоза с использованием современного арсенала гормональных средств имеет ряд существенных недостатков, связанных с трудностью поддержания стойкого гомеостаза адекватными дозами соответствующих препаратов, а также с частыми побочными явлениями и осложнениями при их длительном применении. Ксенотрансплантация культур клеток щитовидной железы особенно актуальна в связи с возможностью лечения послеоперационного гипотиреоза, который является одним из самых распространенных осложнений оперативного лечения диффузного токсического зоба и рака щитовидной железы. Важно отметить и то обстоятельство, что этим заболеванием страдают лица трудоспособного возраста. Предупреждение этого осложнения не может идти по пути увеличения остатка резецированной щитовидной железы, т. к. возрастает опасность развития рецидива этих заболеваний. Это может быть решено путем пересадки клеток щитовидной железы. Особое внимание в этом случае следует уделять подготовке необходимой биомассы трансплантируемой культуры тироцитов и оценке ее качества: специфической активности и биобезопасности.

ПЕРЕЧЕНЬ НЕОБХОДИМОГО ОБОРУДОВАНИЯ, РЕАКТИВОВ, ПРЕПАРАТОВ, ИЗДЕЛИЙ МЕДИЦИНСКОЙ ТЕХНИКИ

1. Электрический термопарный термометр.
2. Автоматические микропипетки со стерильными наконечниками.
3. Весы аналитические.
4. Вытяжной шкаф с ламинарным потоком для работы с культурой клеток (класс 2).
5. Инструменты лабораторные, хирургические: пинцеты, ножницы, зажимы.
6. Иономер (рН-121).
7. Микроскоп инвертированный.
8. Миллипоровые фильтры с диаметром пор 0,22 мкм (стерильные).
9. Пипетки стеклянные стерильные на 1, 5, 10 мл.
10. Посуда лабораторная (чашки Петри, бутылки, колбы).
11. ПЦР-набор для выявления ретровирусов.
12. CO₂-инкубатор.
13. Стекла предметные и покровные.
14. Стерильная клейкая лента для заклеивания культуральных панелей.
15. Стерильные плоскодонные 96-луночные пластиковые планшеты.
16. Стерильные пластиковые флаконы для культур клеток с высокой адгезивной способностью.
17. Термостат, регулируемый, водяной.
18. Центрифуга на 1-5 тыс. об/мин.
19. Центрифужные пластиковые пробирки объемом 0,5-10,0 мл.
20. Штативы для пробирок.
21. Антибиотики: гентамицин, пенициллин, стрептомицин.
22. Глюкоза (40%-й раствор).

23. Гепес.
24. Коллагеназа (тип 2) лиофилизированная.
25. Среда микробиологические в порошке: PPL0, тиогликолевая среда, среда Сабуро.
26. Среда культуральные жидкие (199, IMDM, DMEM) стерильные.
27. Сыворотка фетальная бычья стерильная.
28. Соматостатин.
29. Трипановый синий (0,4%-й раствор).
30. Физиологический раствор (0,9%-й раствор NaCl).
31. Версен (ЭДТА) (0,02%-й раствор).
32. Тиротропин сухой.
33. Трипсин (0,25%-й раствор).
34. Набор для определения тироксина.
35. Фосфатно-солевой буфер (ФСБ), pH 7,4.

ОПИСАНИЕ ТЕХНОЛОГИИ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ МЕТОДА

1. Требования, предъявляемые при работе с культурами клеток

При работе с культурами клеток следует четко выполнять методические инструкции для предотвращения микробной контаминации клеточных культур и защиты от контаминации культуральными материалами окружающего рабочего пространства. Вся работа должна проводиться в специальных стерильных помещениях с ламинарными боксами. Рабочее пространство должно быть обработано УФ-облучателями с интенсивностью не менее 10 ЛК/м³/мин в течение 20 мин. Ламинарные шкафы должны быть не ниже 2 класса защиты и оснащены фильтрационными установками, обеспечивающими чистоту рабочей зоны, соответствующую содержанию микробных частиц менее 10/м³ (до облучения светом в ультрафиолетовом диапазоне). Все приготавливаемые растворы, используемые для выделения и культивирования клеток, должны быть стерилизованы путем пропускания через миллиметровые фильтры с диаметром пор 0,22 мкм.

2. Получение, обработка ткани щитовидной железы и выделение клеток

Получение клеточного материала для трансплантации производят в специализированном центре, аккредитованном для проведения работ с культурами клеток по соответствующим методикам. Выделение клеточной биомассы из тканевых фрагментов щитовидной железы новорожденных кроликов производится двумя врачами-лаборантами или научными сотрудниками, имеющими опыт работы с клеточными культурами не менее 6 месяцев.

На этапе подготовки животных для забора у них тканей следует производить тщательное ежедневное наблюдение за состоянием кроликов, находящихся в специализированном ветеринарно-техническом учреждении (виварии) с целью исключения в популяции больных животных.

Непосредственно перед забором у животных тканей производят постановку полимеразной цепной реакции на ретровирусы с использованием

крови животных. При получении хотя бы одного положительного результата исключают использование данного помета кроликов для получения тканей.

Приготовление посевного клеточного материала для культивирования проводится по следующей схеме:

- ♦ новорожденных кроликов забивают путем декапитации;
- ♦ щитовидную железу новорожденных кроликов извлекают в стерильных условиях и переносят в стерильную чашку Петри с жидкой средой 199, содержащей антибиотики (пенициллин – 100 ед/мл, стрептомицин – 100 мкг/мл);
- ♦ железы разрезают на фрагменты размером 0,1-2 мм, которые заливают 1%-м раствором коллагеназы с 0,25%-м раствором трипсина (в соотношении 1:1) на физиологическом растворе (расход ферментного раствора – 20 мл на 1 г ткани) и инкубируют при температуре 27°C в течение 15 мин с последующим повышением температуры инкубации до 37°C в течение 15 мин при периодическом встряхивании (первая фракция);
- ♦ в том случае, если на дне остаются несепарированные фрагменты их повторно сепарируют с помощью 1%-го раствора коллагеназы в течение 15 мин при температуре 37°C в среде 199 с 0,5%-м фетальной бычьей сыворотки (при том же соотношении ткань/раствор);
- ♦ полученные фракции клеток объединяют, отмывают путем центрифугирования при 300g в течение 6 мин дважды средой 199, доводят до конечной концентрации 150-350 тыс. клеток/мл с помощью соответствующего количества среды DMEM/IMDM (1:1), содержащей 20% фетальной бычьей сыворотки и 50 мЕд/мл тиротропина, и вносят в культуральные пластиковые флаконы, которые помещают в термостат (5%-й CO₂, 37°C).

3. Культивирование клеток

Через сутки после посева клеток следует сменить ростовую среду на аналогичную (среды DMEM/IMDM (1:1) с 20% фетальной бычьей сыворотки и тиротропином (50 мЕд/мл). Культура, получаемая из щитовидной железы новорожденных кроликов, в первые сутки представлена в основном флотирующей фракцией. Со 2-х суток быстро формируется прикрепленная фракция клеток, которая представляет собой многочисленные очаги роста эпителиальных клеток, тесно прилегающих друг к другу. К 5-12 суткам культивирования формируется полный монослой, представленный тесно прилегающими эпителиальными клетками полигональной формы, содержащими в цитоплазме мелкую зернистость. Встречаются также единичные фибробластоподобные клетки. Для замедления дестабилизации культуры тироцитов (что выражается в быстром старении культуры и отставании монослоя к 3 неделе культивирования) в первую неделю культивирования рекомендуется вносить соматостатин в дозах до 5 Ед/мл.

Со 2 недели культивирования постепенный рост функциональной активности тироцитов сопровождается их кратерообразную десквамацию с формированием везикулярных структур – микрофоликулов. Тироциты, выстилающие полость фолликулов, в большинстве случаев имеют

кубическую и призматическую форму, характерную для функционирующих фолликулов зрелой щитовидной железы.

На 14-16 сутки к моменту стабилизации количества микрофолликулов (их количество на протяжении 5 суток на единице площади культуральной посуды остается постоянным) в культуре наблюдается стабилизация функциональной активности культуры и независимое от функциональной активности снижение зернистости в отдельных группах клеток. Пробу культуры в стационарной фазе роста с помощью рабера отбирают для исследования: нагрузочные тесты с тиреотропином (100 мЕд/мл) на этой стадии указывают на возможность возрастания концентрации тироксина в культуре на 300-500% по отношению к исходному на протяжении 2-3 недель.

4. Дополнительный способ стабилизации культуры

Высокая метаболическая активность клеток щитовидной железы приводит к быстрой утилизации нутриентов, ростовых и поддерживающих факторов. При этом быстрое развитие вызывает ускоренное старение культуры и препятствует достижению оптимальных показателей функциональной активности (продукции тироксина) в пересчете на структурную единицу. Для достижения синхронизации культуральных элементов по стадиям развития дополнительно к методам биохимической адаптации рекомендуется использовать методику температурной адаптации культуры. Начиная с 12 суток культуру следует адаптировать к снижению температуры культивирования, с постепенным снижением температуры до 24°C в течение 3 суток и столь же постепенным подъемом ее до 37°C за тот же период. Указанная манипуляция способствует стабилизации тироксинпродуцирующей функции на протяжении более 5 недель в то время, как другие методы могут обеспечить стабильность функции клеток только в течение 3-4 недель.

5. Проверка культуры на микробиологическую чистоту, туморогенность

Микробиологический и вирусологический контроль должны производиться в специализированной микробиологической лаборатории, аттестованной для проведения контроля медико-биологических препаратов. Постановка тестов на отсутствие микроорганизмов-контаминантов и исследование туморогенности согласно методическим рекомендациям «Аттестация перевиваемых клеточных линий-субстратов производства и контроля медицинских и иммунобиологических препаратов» (М., 1989, РД 42-28-10-89) по следующей схеме:

1. Контроль культуры тироцитов на цитопатогенные вирусы производится путем внесения пробы суспензии клеток в перевиваемые культуры клеток ВGM (клетки почки обезьяны) и HeLa (раковые клетки человеческого происхождения). Необходимо проведение 3 пассажей исследуемого материала на культурах для заключения об отсутствии цитопатогенных вирусов.

2. Контроль культуры на контаминацию микоплазмами проводится с использованием селективной среды (PPLO) – 0,5%-й агар, приготовленный на ферментативном переваре сердечной мышцы с добавками.

3. Контроль культуры на бактериальные и микотические загрязнения проводят путем посева проб на питательные среды: кровяной агар, тиогликолевая среда, среда Сабуро. Учет отсутствия контаминации исследуемых проб проводится врачом-микробиологом со стажем практической деятельности не менее 2 лет.

4. Тестирование исследуемых культур на гуморопластическую активность проводят на мышах. Для этого циклоспорин вводят белым мышам подкожно и внутрибрюшинно по 0,1 мл (в дозе 100 000 клеток). Контрольным животным вводят культуру клеток HeLa. Животных наблюдают в течение 15 суток, после чего пунктируют брюшную полость с забором асцитической жидкости (если таковая имеется). Отсутствие узелковых образований в местах введения и отсутствие асцитической жидкости с недифференцированными клеточными элементами свидетельствует об отсутствии туморогенности культуры.

6. Оценка морфологических показателей и функциональной активности культуры

6.1. Идентификация тироцитов

Принадлежность клеток культуры к клеткам щитовидной железы указывают морфологические показатели, характеризующиеся образованием микрофолликулярных структур, в центральной части которых прослеживается образование метакромогенной субстанции (коллоида). Специфическим признаком, характерным для тироцитов, является увеличение количества микрофолликулов, содержащих коллоид под действием тиреотропного гормона (100 мЕд/мл) в течение 2 суток на 20-70% от исходного количества.

6.2. Оценка специфической функциональной активности культуры

Методом радиоиммунного анализа культуральной жидкости с использованием набора для определения тироксина подтверждают специфическую функциональную активность популяции тироцитов в культуре. При этом в процессе культивирования на протяжении первых 2 недель при отсутствии стимуляции тиротропином тироксин в культуре определяется в концентрации более 50 пМ/мл, что свидетельствует о нормальной функциональной активности культуры. В результате тестирования средняя активность тироксина в культуре (после полной смены среды и стимуляции клеток 100 мЕд/мл тиреотропного гормона в течение суток) должна составлять не менее 500 пМ/мл, что соответствует количеству тироцитов от 45 до 150 тыс. клеток и фолликулов на 1 см² площади культурального флакона.

6.3. Оценка количества жизнеспособных клеток

При микроскопии и подсчете в камере Горяева клеток с добавленным красителем – трипановым синим (0,4%)¹ – количество жизнеспособных клеток не должно быть меньше 90%. Данное исследование рекомендуется проводить непосредственно перед их трансплантацией.

7. Отбор культуры и подготовка клеток для трансплантации

Снятие клеток со дна флаконов производится с помощью 0,25%-го раствора трипсина. Культуры освобождают от ростовой среды, бережно отмывают средой 199 и заливают раствором трипсина с последующей инкубацией в течение 5 мин при 37°C. После этого клетки пипетируют и отмывают от фермента средой 199 с 10% фетальной бычьей сыворотки с использованием центрифуги (800 об/4 мин). Надосадок удаляют, осадок ресуспендируют в среде 199 до концентрации 2×10^6 кл/мл. Приготовленную суспензию передают для инкапсуляции и трансплантации в стерильном герметичном контейнере. При транспортировке должен обеспечиваться температурный режим 37°C. Время нахождения клеток в суспензии перед инкапсуляцией и трансплантацией не должно превышать 20-30 мин.

ПЕРЕЧЕНЬ ВОЗМОЖНЫХ ОСЛОЖНЕНИЙ ИЛИ ОШИБКИ ПРИ ВЫПОЛНЕНИИ И ПУТИ ИХ УСТРАНЕНИЯ

- Нарушение режимов инкубации ткани щитовидной железы с ферментами приводит к быстрому образованию монослоя тироцитов (в течение 3 суток) с недостаточной функциональной активностью (менее 50 пМ/мл тироксина при отсутствии стимуляции тиротропином). Поэтому необходимо соблюдение условий обработки ткани ферментами, изложенными в п. 2 описания технологии использования метода.

- Несоблюдение режимов культивирования с факторами, стабилизирующими культуру (соматостатин, тиротропин). Это приводит к быстрому старению культуры и отставанию монослоя к 3 неделе культивирования (при несоблюдении режимов инкубации с соматостатином). При отсутствии стимуляции тиротропином на протяжении первых 2-х недель тироксин в культуре определяется в концентрации менее 50 пМ/мл, что свидетельствует о недостаточной функциональной активности культуры. Поэтому необходимо соблюдение режимов культивирования клеток с факторами, изложенными в п. 3 описания технологии использования метода.

¹ Биотехнология клеток животных. – М.: Агропромиздат, 1989. – 365 с.

Приложение 1

Форма № 1
Отпуск материала разрешен
Руководитель учреждения

«__» _____

Бланк запроса о получении клеточного материала для клинической
трансплантации

1. Учреждение _____
2. Тип запрашиваемого клеточного материала _____
3. Цель приобретения _____
4. Количество запрашиваемого клеточного материала _____
5. Ф.И.О. потенциального реципиента _____
6. Диагноз клинический
развернутый _____
7. Показания для трансплантации
клеток _____
8. Согласие реципиента на трансплантацию получено _____
(да, нет – вписать)

Руководитель учреждения _____
(дата, подпись)

Лицо, ответственное за проведение
манипуляций по трансплантации _____
(дата, подпись)

М.П.

Пример сопроводительной документации, прилагаемой к культуре клеток щитовидной железы для трансплантации

Аналитический паспорт

Культура клеток щитовидной железы для единичной трансплантации
(одна трансплантационная единица)

Дата получения: 24.10.06.

Количество: 9 130 000 кластеризованных жизнеспособных клеток и фолликулов щитовидной железы.

№	Наименование показателей	Допустимые пределы	Результат
1.	Состав	Кластеризованные жизнеспособные клетки и фолликулы	Соответствует
2.	Описание	Однородная суспензия желтоватого цвета	Соответствует
3.	pH раствора	6,8-7,2	Соответствует
4.	Плотность раствора	1,0-1,3	Соответствует
5.	Размер частиц	Не более 300 мкм	Соответствует
6.	Микробиологическая чистота	Полное отсутствие микроорганизмов по результатам микробиологических тестов в аккредитованной микробиологической лаборатории	Соответствует
7.	Количественное определение	10^6 - 10^7 клеток и их кластеров	Соответствует
8.	Транспортирование	При 37°C в герметичном контейнере	Соответствует
9.	Хранение	Экстемпоральный раствор. Использовать в течение 20-30 мин	Соответствует
10.	Основное действие	Продукция тироксина не менее 500 пМ/мл/сут под действием 100 мЕд/мл тиреотропного гормона	Соответствует

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Культуры представлены кластеризованными жизнеспособными клетками и фолликулами щитовидной железы. Общее количество фолликулов и клеток в имплантате составляет не менее 9 130 000. Культуры обладают выраженной тироксинпродуцирующей активностью. Культуры не контаминированы микроорганизмами по результатам микробиологических тестов, не обладают туморопластической активностью.